トピックス

歩くナノ温度計

鈴木 団^{1,2}, 大山廣太郎³, 石渡信一^{1,2,3}¹早稲田大学早稲田バイオサイエンスシンガポール研究所(WABIOS)²早稲田大学重点領域研究機構³早稲田大学先進理工学部物理学科

1. はじめに

モータータンパク質の動きを生きた細胞内で計測しつつ、その場の局所環境も検出できる蛍光プローブを作るという目的で始まった研究¹⁾を紹介する。

局所環境として、我々はまず温度に着目した。歩く分子モーターの温度依存的な活性化を、細胞内で測定することが目標である。これには、活性指標としての運動速度を測定しながら、分子のいるその場所の温度を同時に検出する新しいプローブが必要だった。

2. 蛍光ナノ粒子型温度計の開発と評価

開発した蛍光ナノ粒子型温度計(ナノ温度計)は球状で、核と殻の2層構造を持つ(図1a)。

粒子中心部の核には蛍光色素を閉じ込め、温度計の機能を持たせる。核を取り囲む殻は媒質から核を遮蔽し、かつアニオン性の細胞膜への付着を促すためカチオン性にする。

透過型電顕画像から求めた核の平均半径は113 nmだった。また動的光散乱法から求めた、希薄溶液中での流体力学的半径は211 nmだった。これが、細胞へ応用する際のナノ温度計の大きさの目安となる。また、粒子の表面電位は+60 mV (pH 7.4) だった。

PBS中に分散させたナノ温度計の蛍光強度は、20~60°Cの温度上昇に伴い一定の割合で低下した。温度感受性を1°C当りの蛍光強度の減少として定義すれば、25°C基準で2.2%/°Cだった(図1b)。

特定のパラメータを測定しようとするプローブの開発でしばしばつきまとう問題は、それが目的のパラメータ以外にも反応してしまうことである。細胞内ではpHやイオン濃度が変動するが、その変動幅は小さいという報告がある²⁾⁻⁵⁾。しかし、ナノ温度計が存在する細胞内の超局所で、それらが大きく変動する可能性は否定できない。

我々のナノ温度計の場合、顕微鏡下で直接測定されるのは、蛍光強度の変化である。そこで温度一定のもと、様々なpHやイオン強度でナノ温度計の蛍光強度を測定した。その結果、設計通り、pHは4から10、イオン強度は0から500 mMの範囲で、応答性は見られなかった(図1b)。

ナノ温度計は高輝度ナノ粒子である。よって単一粒子ごとにその2次元位置を決めることができる。実際、1秒間の標準誤差(SEM)から求めた位置決め精度は ± 5.3 nm ($1.96 \times \text{SEM}$, 測定値の95%が入る範囲)だった。またこの間の蛍光強度変化のSEMから見積もった、温度の測定精度は $\pm 0.3^\circ\text{C}$ となった。我々はこれを、我々の光学顕微鏡におけるナノ温度計の温度分解能と定義した。次に115.8 Hzで画像を取得しながら熱パルス^{6),7)}を与え、温度変化の時間経過を測定した。温度の立ち上がり、立ち下り共に2フレーム以内に完了した。よって時間分解能は17ミリ秒($115.8/2 = 57.9$ Hzの逆数)未満であると定めた。

図1

(a) 核には疎水性の高い蛍光色素 europium tenoyltrifluoroacetate (Eu-TTA) と fluorescein 5(6)-isothiocyanate (FITC) とが、poly (methyl methacrylate) (PMMA) ポリマーに封入されている。UV 光 ($\lambda = 365$ nm) で励起される Eu-TTA は温度計として用い、UV 励起のできない共焦点蛍光顕微鏡でも粒子を可視化するために、FITC を用いた。殻にはカチオン性のポリマー poly(allylamine hydrochloride) (PAH) を用いた。(b) ナノ温度計の蛍光強度は温度増加に対してほぼ線形に減少するが(左)、pH やイオン強度を変えても反応しない(中・右)。

Walking Nanothermometer

Madoka SUZUKI^{1,2}, Kotaro OYAMA³ and Shin'ichi ISHIWATA^{1,2,3}¹Waseda Bioscience Research Institute in Singapore (WABIOS), Waseda University²Organization for University Research Initiatives, Waseda University³Department of Physics, Graduate School of Advanced Science and Engineering, Waseda University※図1, 図2は、電子ジャーナル (<https://www.jstage.jst.go.jp/browse/biophys/-char/ja/>) ではカラー版を掲載しています。

3. 分子モーターの温度依存的な活性化の細胞内測定

ナノ温度計は、培地に混ぜて1, 2時間放置するだけで自然に細胞に取り込まれた。細胞内小器官との共局在を確認すると、エンドソームやライソソームといった酸性細胞内小器官へ取り込まれ、微小管に沿って能動輸送されることもわかった。

ナノ温度計の位置決め精度は、細胞内での能動輸送速度を測定するのに十分である。そこで細胞に数秒の熱パルスを与え、輸送の速度変化を測定することにした。予想される動きは、①熱パルス中は温度が高いため、ナノ温度計は速く移動する。同時に、ナノ温度計の蛍光強度は減少する。②熱パルス終了と共に、温度は元に戻る。ナノ温度計の蛍光強度も運動速度も、パルス前と同じになる。

やってみると、予想通りだった(図2a)。36°Cから平均47.2°Cまで上げると、1秒間の移動距離から計算した速度は0.32 $\mu\text{m/s}$ から0.93 $\mu\text{m/s}$ に上昇し、パルス後は0.32 $\mu\text{m/s}$ に戻った(図2b)。1秒程度であれば、たとえ47°Cであってもモータータンパク質の機能は破壊されないことがわかる。

温度が10°C上昇したときの速度の変化率 Q_{10} 値は、 $(0.93/0.32)^{10/(47.2-36.0)} = 2.6$ と計算され、*in vitro* 滑り運動系での2と比べて有意に大きかった。この原因はいくつか考えられる。たとえば、細胞内小胞の輸送は、微小管を互いに逆方向へ移動するキネシンとダイニンによって担われている。温度変化が発生力や微小管と作用する分子数を変化させて、綱引きの力バランスに影響を与える可能性がある。また温度変化によって細胞内 Ca^{2+} 濃度も変わる⁷⁾。 Ca^{2+} 濃度に依存する制御系タンパク質の働きによって、モータータンパク質の活性が変化している可能性もある。さらに、温度が上がると、細胞質の粘性が水以上に大きく減少するという報告もある⁸⁾。細胞質の見かけの粘弾性に温度依存性があり、これがミクロンサイズの細胞内小胞の動きを大きく変化させている可能性も高い。

図2 (a) 細胞内を歩く温度計に熱パルスを与え、温度依存的な能動輸送速度の変化を計測。(b) 温度(上)と輸送速度(下)の時間変化を1つのプローブで測ることができる。

4. おわりに

細胞内を能動輸送される小胞の位置と温度を画像フレームごとに決定する手法を開発することができた。すなわち、細胞内を「歩くナノ温度計」として機能する蛍光ナノ粒子を作製できたことになる。このような、ターゲットの活性(細胞機能)と局所温度情報を細胞内で同時に記録することができる手法は、溶液系での活性(機能)の温度依存性とは異なる、細胞固有の情報を我々に提供してくれることだろう。

謝 辞

本項で紹介した研究は早稲田大学大学院生命医科学専攻の武岡真司教授、同研究室の高林昌生氏、武井義明氏、および同大学 WABIOS の新井敏博士との共同で行ったものです。皆様にお礼申し上げます。本研究は、文部科学省による支援を受けて行われました。

文 献

- 1) Oyama, K. *et al.* (2012) Lab Chip **12**, 1591-1593.
- 2) Bright, G. R. *et al.* (1987) J. Cell Biol. **104**, 1019-1033.
- 3) Llopis, J. *et al.* (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. USA **95**, 6803-6808.
- 4) Modi, S. *et al.* (2009) Nature Nanotech. **4**, 325-330.
- 5) Ohtsuka, K. *et al.* (2012) Chem. Commun. **48**, 4740-4742.
- 6) Zeeb, V. *et al.* (2004) J. Neurosci. Methods **139**, 69-77.
- 7) Tseeb, V. *et al.* (2009) HFSP J. **3**, 117-123.
- 8) Fushimi, K., Verkman, A. S. (1991) J. Cell Biol. **112**, 719-725.

鈴木 団

鈴木 団(すずき まどか)

早稲田大学重点領域研究機構主任研究員(研究院准教授)

早稲田大学大学院博士課程満期退学, 博士(理学)。2009年9月より在星研究所の主任研究員, 12年4月より現職。

研究内容:細胞の力学的・熱的物性と機能の外部制御

連絡先:11 Biopolis Way, #05-01/02 Helios, Singapore 138667

E-mail: suzu_mado@aoni.waseda.jp

URL: <http://www.waseda.jp/WABIOS/jp/>

大山廣太郎

大山廣太郎(おおやま こうたろう)

早稲田大学先進理工学部助教

日本学術振興会特別研究員(DC1)を経て、早稲田大学大学院博士課程修了, 博士(理学)。2012年4月より現職。

研究内容:局所温度測定と熱パルス法を用いた細胞内の局所的な温度の理解

E-mail: kou_oyama@akane.waseda.jp

石渡信一

石渡信一(いしわた しんいち)

早稲田大学先進理工学部教授

名古屋大学大学院博士課程満期退学, 理学博士。研究内容:生体分子モーターの仕組みと生体構造形成機構の研究

連絡先:〒169-8555 東京都新宿区大久保 3-4-1

E-mail: ishiwata@waseda.jp

URL: <http://www.ishiwata.phys.waseda.ac.jp/>